

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Eukarióta kromatinszerkezet az R-hurkok és a  
hisztonmódosítások összefüggésében**

Halász László

Témavezető: Dr. Székvölgyi Lóránt



DEBRECENI EGYETEM  
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2018

# **Eukarióta kromatinszerkezet az R-hurkok és a hisztonmódosítások összefüggésében**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Halász László**  
okleveles Molekuláris Biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai doktori iskolája  
keretében

Témavezető: Dr. Székvölgyi Lóránt

## **A doktori szigorlati bizottság:**

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, az MTA rendes tagja  
tagok: Dr. Vámosi György, PhD  
Dr. Pankotai Tibor, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és  
Molekuláris Biológiai Intézet, 2017. április 28. 11 óra

## **Az értekezés bírálói:**

Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora  
Dr. Bodai László, PhD

## **A bírálóbizottság:**

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, az MTA rendes tagja  
tagok: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora  
Dr. Bodai László, PhD  
Dr. Vámosi György, PhD  
Dr. Pankotai Tibor, PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tantermében  
2019. február 15. 14:15

## 1. Bevezetés

### 1.1. Az eukarióta kromatin szerkezet és szerveződési szintjei

Az egyedfejlődés és az élet során, az egyes szövetek és szervek megfelelő működésének biztosítása érdekében nagy mennyiségű és rendkívül különböző sejtekre van szükség. Mivel a sejtmag limitált térfogata nem engedi meg, hogy a DNS szál megfelelő térbeli elrendezés nélkül illeszkedjen benne, ezért az eukarióta sejtek olyan molekuláris mechanizmusokat fejlesztettek ki, amelyek lehetővé tették DNS tartalmuk többrétegű skálázódását az interfázis során (a kromoszómális territóriumoktól az interakciós kromatin hurkokig).

Az eukarióta sejtek genomja kromatinba szerveződik, amely hierarchikus szinteket mutat. Az elsődleges szinten a nukleoszóma képviseli az eukarióta kromatin alapvető ismétlődő építőköveit. A nukleoszóma DNS-t, strukturális nem kódoló RNS-eket és társult fehérjéket tartalmaz. A nukleoszóma központi hisztonoknak nevezett speciális fehérjéből áll, amelyet a DNS ~147 bázispárral borít be. A központi hiszton oktamer két H2A, H2B heterodimerből, két H3/H4 heterodimerből és egy H1 összekötőből áll. A nukleoszóma egységei a szomszédos nukleozomához DNS szekvenciákkal kötődnek, amelyek "összekötő" DNS néven ismeretesek és nukleoszóma láncot hoznak létre. A kromatin legfontosabb feladatai között van a DNS kompakt formában tartása, a DNS-károsodás megelőzése, valamint a génexpressziós programok és a replikáció szabályozása.

A nukleoszóma 10-30 nm-es kromatinrostokba szerveződik, amelyek különböző, magasabb rendű struktúrákat képezhetnek, lehetővé téve a genom hatékony funkcionális elrendezését. A közelmúltban végzett vizsgálatok a magasabb rendű genom-szerveződés két kiemelkedő jellemzőjét tárják fel; váltakozó aktív és inaktív kromatin régiók (1-10 Mb, A-B szerkezetek) és topológiailag asszociált domének (TAD, <1 Mb). A TAD-ok általában az interfázisos kromoszómák alapvető strukturális és funkcionális építőkövei, azonban a TAD kialakulásának alapját képező mechanizmusok még nem ismertek.

A kromatin funkciója szorosan kapcsolódik háromdimenziós szerkezetéhez. Mint már említettem, a DNS hozzáférhetősége alapján a kromatin általában két fő részbe sorolható: eukromatin és heterokromatin. Az eukromatin génekben gazdag állomány, nyitott és aktív (A-rész), míg a heterokromatin kondenzált, és génexpresszió nem jellemző (B-rész). Ezt a besorolást számos genom-szintű vizsgálat finomhangolta több egyedi tulajdonsággal rendelkező kromatinállapotba. Minden információt figyelembe véve, a genom úgy működik, mint egy információlelővő gép, amelyben a 3D kromatinszerkezet kritikus fontosságú a kiválasztott információ prezentálásának és a sejtazonosság szempontjából. Érdekes módon a kromatin dinamikus, és képes helyi vagy globális körülmények között például sejtosztódásra, transzkripcióra, differenciálódásra, rekombinációra, valamint belső vagy külső ingerre válaszul képes drasztikusan megváltoztatni konformációját. A kromatinszerkezet zavarai gyakran kapcsolódnak a fejlődési rendellenességekhez és különböző betegségekhez, mivel specifikus gének vagy génhálózatok szabályozása sérülhet.

A genom-szerveződés egy nagyon összetett, többrétegű folyamat, amelyben sok szereplő vesz részt. Számos strukturális fehérjét jellemeztek, amelyeknek fontos szerepe van a kromatin hurkok és a háromdimenziós szerkezetek kialakulásában: CCCTC-kötő faktor (CTCF), YY1 és a kohézin komplex. A kötődésüket a helyi hiszton környezet, a másodlagos DNS struktúrák és a DNS szekvencia szabályozza.

A kromoszómák térbeli szerveződésének tanulmányozásához két fő megközelítés létezik: mikroszkópos és molekuláris vizsgálatok. A fénymikroszkópos vagy fluoreszcens mikroszkópos megközelítés kis felbontású (50-100 nm) fizikai információt nyújt kromoszómák eloszlásáról és alakjáról az egyes sejtekben. A háromdimenziós kromoszóma és kromatinszerkezet nagy felbontású vizualizációja mikroszkóppal még mindig nehéz. Habár vannak olyan új technikák, amelyek lehetővé teszik ezt. A kromatinszerkezet

tanulmányozására szélesebb körben használt módszerek a kromoszómakonformációt rögzítő (3C) technológián, a szekvenáláson és a bioinformatikán alapulnak. Ezek a vizsgálatok (4C, 5C, 6C, ChIA-PET, CHIP-Loop, HiChIP és Hi-C) relatív térbeli interakciós valószínűségeket biztosítanak két lineárisan távoli lókuszt között egy sejtpopulációban közel 1 kilobázisos felbontásban. Érdemes megjegyezni, hogy egyedi sejttes megközelítések is rendelkezésre állnak Hi-C-hez. Legújabbban a kutatók kifejlesztették a tiramidszignál amplifikációt (TSA-seq), az első genomsekvencálás alapú módszert, amely képes teljes-genom szinten kromoszómális lókusztok citológiai távolságainak becslésére.

Összefoglalva, a genom háromdimenziós szerkezete fontos a sejtek információtartalmának kifejezésére és viselkedésére. Így nem meglepő, hogy a 3D vagy 4D kromatinszerkezet tanulmányozása központi téma lett a genomika területén.

## 1.2. A hisztonmódosítások

Amint az előző fejezetekben említettem, a genomi szerveződés elsődleges szintje a nagymértékben konzervált hisztonfehérjékből álló nukleoszómaszerkezet. A hisztonfehérjének túlnyúló N-terminális aminosav oldalláncuk van, amely poszttranszlációs módon módosítható (PTM) és befolyásolja a kulcsfontosságú sejttes eseményeket, beleértve a kromatinszerveződést, a nukleoszómadinamikát, a génexpressziót és a rekombinációt. A PTM-ek hatalmas szabályozási potenciállal rendelkeznek.

A főbb módosítások közé tartozik az acetiláció, a foszforiláció és a metiláció. Léteznek más ismert módosítások is, mint például a deimináció, az ADP riboziláció, az ubikvitinálás, a krotonilálás, a SUMOiláció és a GlcNAciláció. A közelmúltban végzett vizsgálatok kimutatták, hogy nemcsak a hiszton túlnyúló oldalláncai, hanem a DNS-sel közvetlen kapcsolatban álló magfehérjék felszíne is módosítható. A hisztonmódosítások és azok a fehérjekomplexek, amelyek ezeket a poszttranszlációs módosításokat írják, felismerik és eltávolítják, központi szereplővé válnak a sejtek fiziológiai állapotának és identitásának a szabályozásában.

## 1.3. H3 hisztonmetiláció

A H3 hisztonfehérje lizin metilációjának a szintjét metiltranszferázok és demetilázok együttesen szabályozzák. Három metilációs állapot létezhet ezen a lizin oldalláncon: mono-, di- és trimetiláció, amely eltérő biológiai funkcióval jár. Fontos megjegyezni, hogy ezeknek a módosításoknak egyike sem változtatja meg az aminosav töltését és így a nukleoszóma szerkezetét, de más effektor fehérjék dokkolóhelyeként szolgál. Az acetilációval ellentétben, amelynek felezési ideje több perc, a metiláció stabilabbnak tekinthető.

A *Saccharomyces cerevisiae* esetében a H3K4me3 általában a közeli gének aktivitásával asszociált, mivel nukleoszóma átalakító faktorokat (CHD1 és BPTF) rekrutál, míg a negatív regulátorok kötődését (NuDR) blokkolja és szintje korrelál a transzkripció sebességével az interfázisos magon belül. A transzkripció folyamata során a H3K4me3 gyorsan előállítható a transzkripciós kezdőhelyeknél vagy promótereknél, az RNAP-hez társított Set1 fehérje által. Aktív transzkripciónál jelen van, sőt még akkor is, ha a Set1 már nincs ott, így a legutóbbi transzkripció memóriajelét hagyva hátra. Másrészt a gén csendesítésekor H3K4me3 jelek elvesznek. A transzkripció mellett a H3K4me3 szintén hozzájárul az osztálykapcsoló rekombinációhoz, az S-fázisban lévő DNS-károsodás ellenőrzési ponthoz és a meiotikus rekombinációhoz.

## 1.4. Set1C/COMPASS

A metiláció egy evolúciósan konzervált mechanizmus. Élesztőben a metilációt a SET-domént tartalmazó lizin-specifikus metil-transzferáz végzi; Set1. A *Drosophila melanogaster* modellorganizmusnak három, míg az embernél hat Set1 homológ létezik. A Set1 önmagában inaktív, mivel ez a fehérje egy nagyobb komplexet alkot hét további fehérjével: Spp1, Bre2, Swd1, Swd2, Swd3, Sdc1 és Shg1. A komplexet Set1 komplexnek (Set1C vagy COMPASS) nevezzük. Ezenkívül a Set1 SET-doménjének bármilyen változása az enzim komplexképzésének és aktivitásának teljes elvesztését eredményezi. Minden egyes alegység a komplex egy specifikus feladataért felelős.

A Set1, a Swd3 és a Swd1 elengedhetetlenek a komplex stabilitásához és működéséhez, mivel ezeknek az alegységeknek a hiányában a H3K4 metilációja a sejtekben nem megfelelően megy végbe. Az Swd2 alegység szükséges az optimális di- és trimetilációhoz, de a monometilációhoz nem. A Swd2 elősegíti a hasítási és poliadenilációs faktor (CPF) funkcióját, amely transzkripció terminációban részt vevő komplex. Az Spp1 COMPASS komponenst tartalmazó PHD-domén segíti a potenciális DSB helyek rekrutálását a kromoszómatengelyhez, lehetővé téve a Spo11 fehérjének a DNS duplaszál törések létrehozását. Ezenkívül ez az alegység szabályozza a Set1C katalitikus aktivitását is. Hasonlóképpen a Set1C Swd2, Sdc1 és Bre2 alegységei a megfelelő H3K4 di- és trimetilációhoz, de nem monometilációhoz szükségesek.

Összefoglalva, annak ellenére, hogy a H3K4me3 az egyik legkevésbé jelenlévő hisztionmódosítás, a H3K4me3 az aktív transzkripció és rekombináció nagyon fontos és konzervált epigenetikai markere. A metiláció írásának és törlésének molekuláris mechanizmusa a tudományág egyik kiemelkedően fontos területe. Továbbá, amint azt a Swd2 és az Spp1 esetében már azonosították, más Set1C alegységek is részt vehetnek a különféle biológiai folyamatokban Set1C-független módon.

## 1.3. A meiotikus duplaszál törések kialakulása és kapcsolatuk a H3K4 trimetilációval

A meiotikus profázis I során a rekombinációt a meiotikus Spo11 nukleáz generálta programozott DNS-duplaszál törések (DSB) iniciálják nem-véletlenszerű genomi régióknál. Ezek a DSB-k később javíthatók homológ kromoszómák alkalmazásával, amelyek átkereszteződést eredményeznek. Mechanikusan egy DSB egy nagyon szervezett kromatin környezetben keletkezik. A DSB-k eloszlása és gyakorisága gyakran kromoszómákonként változik, és gyakran 1-2 kilobázis nagyságú forrópontokban koncentrálódik. A forrópontok általában H3K4me3 által szegélyezett, ritkán fordulnak elő exonokban vagy génterminális helyeken, illetve kialakulásuknak kedveznek a nukleoszóma-mentes régiók a génpromóterek közelében. Azonban a specifikus helyek forrópontá válásának a mechanizmusa, valamint a kromoszóma tengelyhez horgonyozása kevésbé ismert.

A kikötött-hurok-tengely modell azt javasolja, hogy az Spp1, a Set1C H3K4me3 olvasó alegységét tartalmazó PHD ujjdomén kölcsönhatásba lép mind a H3K4me3 módosításokkal, mind a kromoszómatengely fehérje REC114-MEI4-MER2 komplexekkel (RMM). Ez a kölcsönhatás a távoli DNS szekvenciákat a kromoszómatengelyhez rekrutálja, lehetővé téve a Spo11 által történő hasítást és az azt követő javítást. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az Spp1 egy sokrétű molekula, és a H3K4-trimetiláció kulcsszabályozójaként van jelen. A meiotikus DSB kialakulásának számos aspektusát feltáró intenzív kutatás ellenére a Set1C alegységek nukleáris dinamikája még ismeretlen.

#### 1.4. Az RNS-DNS hibridek (R-hurkok)

Az RNS-DNS hibridek (R-hurkok) az életfa minden szintjén előforduló epigenetikai markerek. Az R-hurkok akkor alakulnak ki, amikor egy RNS molekula a vele homológ DNS molekulával hibridizál, létrehozva ezzel egy RNS-DNS hibridet és egy kitaszított egyszálú DNS szakaszt. A korai tudományos kutatások az R-hurkokat a genom-instabilitás potenciális forrópontjainak tekintette, mivel az egyszálú rész hajlamos a DNS károsítására, és mutációt vagy kromoszómális átrendezéseket hozhat létre. Egyre több bizonyíték utal azonban arra, hogy az R-hurkok masszívan jelen vannak fiziológiás körülmények között is és olyan kritikus sejtfolyamatokat szabályoznak, mint például a transzkripció faktorok kötődése, génexpresszió vagy heterokromatin-képződés. Éppen ezért, ezeknek a struktúráknak a pontos azonosítása és jellemzése kulcsfontosságú.

#### 1.5. Az R-hurkok kialakulása és funkciói

Az R-hurkok az emlős rendszerek jelentős epigenetikai jellemzői. Becslések szerint az emberi genom ~5%-a képes R-hurkot létrehozni. Az utóbbi időben számos modell született, mellyel leírták az R-hurkok kialakulását. A Lieber és Roy által javasolt modellek: a "visszafűződéses" és a "kiterjesztett hibrid" modell. A visszafűződéses modellben az egyszálú, naszcens RNS rövid idő alatt hibridizál a vele komplementer DNS szekvenciával. Míg a kiterjesztett hibrid modellben R-hurok alakul ki abortív transzkripció során. Ezeket a mechanizmusokat cisz-R-hurok formációknak is nevezik, mivel a transzkripcióhoz közvetlenül társulnak. Általánosan elfogadott, hogy a legtöbb R-hurok transzkripció során módon jön létre. Az R-hurkok azonban mind a kódoló, mind a nem kódoló genomban előfordulnak. A korábbi modellek mellett a transz-R-hurok kialakulása is fontos szerepet játszik. A transz-R-hurok modell szerint az RNS molekula a genom más régiójából is származhat. Ezek az RNS-ek lehetnek szabályozó, hosszú, nem kódoló RNS-ek (lncRNS), körkörös RNS-ek (circRNS) vagy ismétlődő RNS-ek. Bizonyos esetekben mind a cisz-, mind a transz-R-hurok jelen lehet egy adott régióban. Ez az úgynevezett vegyes modell.

Az R-hurok kialakulása nem véletlenszerű folyamat. A genomban számos alapvető meghatározó tényező van, amely elősegíti vagy gátolja az R-hurok kialakulását. Az itt felsorolt funkciók szorosan átfednek egymással. Korai *in vitro* vizsgálatok azt mutatták, hogy az R-hurok kialakulása nagymértékben összefügg a szekvencia környezetével. A hatékony R-hurok iniciáláshoz G-gazdag, naszcens RNS-ekre van szükség, különösen guanin-klaszterekkel. Már az egy G-klaszter (G4) jelenléte segíti a rövid szekvenciáknál az R-hurok iniciációt. Az R-hurok elongációja az iniciációs helyeken túl, nem függ a G-klaszterektől. Más tanulmányok kimutatták, hogy a nem-metilált CpG-sziget (CGI) promóterek GC ferdeséggel történő átírása R-hurok képződést eredményez. DNS szupertekercselődés vizsgálatok kimutatták, hogy a negatív topológiai stressz szorosan kapcsolódik az R-hurok kialakulásához. Más megfigyelések azt mutatták, hogy az R-hurok kialakulása valószínűbb olyan promóter szekvenciáknál, amelyeknél RNS polimeráz II többlet van. A nyitott, aktív kromatin régiók és a magas transzkripció ráta pozitív korrelációt mutatnak az R-hurok képződésével. Érdekes módon, az R-hurkokkal rendelkező gének nagyobb mértékben expresszálódnak az R-hurok nélküli génekhez képest. Az R-hurkok represszív kromatinállapotokban is kialakulhatnak. Egy nemrégiben megjelent tanulmányban Chédin és kollégái azt bizonyítják, hogy a génhez kapcsolódó R-hurkok dinamikusan változnak. Továbbá, R-hurkok kialakulhatnak a genom intergénikus régióin belül is (ismétlődő elemek, telomerikus és pericentromerikus szakaszok).

Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy az R-hurok képződése egy komplex kölcsönhatás a nukleotid-szekvencia, transzkripció, DNS-topológia és más kromatin-tulajdonságok között. Az R-hurok képződésének és funkcióinak növekvő bizonyítéka ellenére ezeknek a folyamatoknak a mechanisztikus részletei még nem tisztázottak.

## 1.6. Az RNS-DNS hibridek azonosításához alkalmazott módszerek

Az R-hurok elektronmikroszkóppal történő felfedezése óta számos más technika áll rendelkezésünkre ezen struktúrák azonosítására. A terület egyik legfontosabb mérföldköve az R-hurok-specifikus monoklonális antitest (S9.6) kifejlesztése volt 1986-ban. Ez az antitest nagy affinitással kötődik az R-hurok RNS-DNS hibrid részéhez. Az S9.6 antitest lehetővé tette az R-hurok *in vivo* tanulmányozását számos különböző molekuláris biológiai technikával, mint például az immunfluoreszcens képalkotás vagy a nagy áteresztőképességű szekvenálás.

A leggyakrabban használt módszer a DNS-RNS immunprecipitáció, majd kvantitatív PCR (DRIP-qPCR) vagy újgenerációs szekvenálás (DRIP-seq). Röviden, az extrahált genomális DNS-t szonikálással vagy restrikciós enzimekkel fragmentáljuk. A következő lépésben az S9.6 antitestek felismerik a DNS fragmentumok hibrid szerkezetét, miközben többszöri mosást követően eltávolítjuk a nem jelölendő fragmentumokat. Miután a fragmentumokat a gyöngyökről eluáljuk, az antitest-DNS-RNS hibrid kapcsolat megszűnik. A kísérlet utolsó lépésében a tisztított nukleinsav fragmentumokat qPCR vagy NGS segítségével kvantitáljuk. Általában RNáz H1 kezelést is használnak negatív kontrollként.

Néhány évvel az eredeti DRIP protokoll után, számos kiegészítő módszert fejlesztettek ki. Ezeket a módszereket az immunprecipitációs cél (DNS vagy protein), a szekvenált molekula (DNS vagy RNS) és a könyvtárkészítés alapján lehet csoportosítani.

Az S1-DRIP-seq az eredeti módszer továbbfejlesztett változata. S1 nukleáz kezelést alkalmaznak az immunprecipitáció előtt, ami jobb jel-zaj arányt eredményez.

A DRIP-RNS-seq és a DRIPc-seq módszerek a DRIP protokoll lépéseit követik az immunprecipitáció lépéséig. A tisztított és dúsított RNS-DNS hibrideket denaturáljuk és DNáz I-gyel kezeljük a DNS szennyező anyagok eltávolítása céljából. A fennmaradó RNS molekulákból szálspecifikus RNS-seq könyvtárat készítenek, majd megszekvenálják azt. Ezeknek a megközelítéseknek az egyértelmű előnye, hogy információt kapunk a hibridek orientációjáról.

További alkalmazott módszerek során egyszálú DNS ligációs-alapú könyvtárkészítést alkalmaznak az DNS-RNS hibrid immunprecipitáció után, nagy teljesítményű szekvenálással (ssDRIP-seq) kombinálva. A feldúsított hibrid régiókat tartalmazó DNS mintákat szonikáljuk és denaturáltuk 95 °C-on, hogy egyszálú DNS-t kapjunk a könyvtár előkészítése és a szekvenálás előtt. Más módszerek, mint például a DNS-RNS *in vitro* dúsítás (DRIVE-seq) és az R-ChIP, katalitikusan inaktív, de kötésre képes RNáz H1 mutáns fehérjét alkalmaznak. A DRIVE-seq egy affinitásos „pulldown” vizsgálaton alapul, míg az R-ChIP egy kromatin immunprecipitáción alapuló módszer.

A legújabb alternatív módszer a bisDRIP-seq, mely egy biszulfid-alapú megközelítés az R-hurok bázispáros feltérképezésére az egész genomban. A módszer mögötti koncepció az, hogy a biszulfidkezelés szelektíven átalakítja a nem metilált citozint uracilra az R-hurok szerkezet egyszálú DNS-szakaszában, nem denaturáló körülmények között. Továbbá, az R-hurok RNS-DNS hibrid része a C-U konverzióktól védett, így ez a módszer egy szálspecifikus és nagy felbontású R-hurok térképezési módszert biztosít. Legfőbb hátránya a citozinok és a metiláció egyenetlen eloszlása. További technológiák kifejlesztése várható, mint például az új, hosszú leolvasású és egyetlen molekulás szekvenálás vagy más R-hurok kötő fehérje-alapú megközelítés, mint például az ssDNS-kötő, replikációs fehérje A (RPA-ChIP).

## 2. Célkitűzések

1. RNS-DNS hibrid (R-hurok) immunprecipitáció: egy analitikus munkafolyamat a benne rejlő torzítások becslésére.

- Az esetleges torzító hatásokat előidéző fő kísérleti változók meghatározása és szisztematikus vizsgálata az R-hurkok azonosítása során DNS-RNS immunprecipitációval (DRIP)
- A DRIP módszer szenzitivitásának és specifitásának meghatározása
- Az elérhető publikus R-hurok adatok összehasonlító funkcionális analízise
- Az optimális restriktációs enzim használatára vonatkozó információk biztosítása, annak érdekében, hogy elkerülhető legyen a torzított genomi mintavételezés
- Egy optimalizált DRIP protokoll ajánlása a tudományos közösségnek

2. Az Spp1 kromatin kötésének funkcionális vizsgálata a meiózis folyamata alatt.

- Az Spp1 kromatin kötésének kinetikájának vizsgálata a meiózis alatt
- Az eltérő kötési kinetikával rendelkező kötőhelyek funkcionális karakterizálása



### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. DNS-RNS immunprecipitáció (DRIP)

A sejtek keresztkötéséhez 1%-os paraformaldehid oldatot használtunk 10 percig, aminek a hatását 2.5 M glicinnel szüntettünk meg 5 perc alatt szobahőmérsékleten. A sejteket 1 ml lízis pufferben (500 µl 2x lízis és 500 µl TE) lizáltuk. A sejtízist két különböző hőmérsékleten is elvégeztük: 65 °C 7 óra vagy 37 °C egy éjszakán át. A teljes nukleinsav izolálást NucleoSpin Tissue Kit segítségével végeztük el és 100 µl elúciós pufferben eluáltuk a mintákat. A tisztított nukleinsav preparátumot 300 µl Tris-HCl (pH 8.5) oldatban fragmentáltuk szonikálással kétszer 5 perc alatt, hogy átlagosan ~500 bázispár méretű DNS fragmenteket kapjunk. A fragment analízist 1%-os agaróz gélelektroforézissel végeztük el. Amennyiben szükséges volt, további szonikálást alkalmaztunk. A szonikált DNS mintákat NucleoSpin Gél és PCR tisztító kittel tisztítottuk, majd 100 µl elúciós pufferben eluáltuk. 12 µg DNS-t 100 µl térfogatra hígítottunk 5 mM Tris-HCl (pH 8.5) oldattal. A minták 2%-át input DNS-ként eltettük. A minták felét 80 µl végtérfogatban 8 µl RNase H-val kezeltük 37 °C-on egy éjszakán át. A Dynabeads Protein A mágneses gyöngyöket PBS/EDTA tartalmú 0.5%-os BSA-val blokkoltuk. Az S9.6 antitest immobilizáció érdekében, 50 µl blokkolt gyöngyöt 10 µg S9.6 antitesttel inkubáltuk folyamatos forgatás közben IP pufferben 4 °C-on 4 órán át. 6 µg emésztett genomi DNS-t adtunk a keverékhez és gyengéden forgattuk egy éjszakán át 4 °C-on. A gyöngyöket kigyűjtöttük és mostuk egymás után 1 ml lízis pufferrel (alacson só), 1 ml lízis pufferrel (magas só), 1 ml mosó pufferrel és 1 ml TE-vel 4 °C-on, kétszer. Az elúció 100 µl elúciós pufferrel történt 15 percen keresztül 65 °C-on. NucleoSpin Gél tisztítás és PCR Clean-up kit után, a nukleinsavakat 55 µl elúciós pufferben eluáltuk. A kinyert DNS-t kvantitatív valós-idejű PCR készülékkel (LightCycler 480, SYBR Green I Master) mértük le és QuantStudio 12K Flex valós-idejű PCR rendszerrel elemeztük ki. Az adatokat az összehasonlító C<sub>T</sub> módszerrel analizáltuk. Az RNS-DNS hibrid feldúsulást az IP/Input arányból számoltuk ki.

#### 3.2. DNS-RNS immunprecipitáció és szekvenálás (DRIP-seq)

A szekvenálási könyvtárakat az Illumina TruSeq ChIP preparációs protokoll alapján készítettük el. Röviden, az immunprecipitáció során feldúsult ChIP DNS molekulák vége javítva lett és az inzertekhez index adaptereket ligáltunk. A tisztított ligációs termékeket PCR segítségével amplifikáltuk, majd megszekvenáltuk. A leolvasott szekvenciákat az emberi referencia genomra illesztettük *BWA MEM* algoritmussal alapbeállítások mellett. Kiszűrtük azokat a leolvasott szekvenciákat, amelyek alacsony térképeződési értékkel rendelkeznek, PCR duplikátumok vagy feketelistás régiók találhatók. A replikákat összevontuk és MACS2-t használtunk a szignifikáns genomi régiók azonosításához input-normalizálás mellett. A feldolgozott és összevont illesztésekből *bamCoverage* alkalmazásával szignálfájlokat generáltunk. Az RPKM értékeket 20 bázispáros ablakokban határoztuk meg minden egyes mintára egy 60 bázispáros csúszóablak alkalmazásával. Az elkészített szignálfájlokat R-ben ábráztuk *ggplot2* és *ggbio* csomagok segítségével.

#### 3.3. Az RNS-DNS hibridek genomi annotációja

A DRIP régiók genomi eloszlásának a meghatározásához a GenomicRanges R csomagot alkalmaztuk, amellyel a DRIP régiók és az annotációs kategóriák átfedő területeit meghatároztuk. Az átfedő területeket a véletlen generált átfedésekhez hasonlítottuk.

### 3.4. *In silico* restrikciós enzimatis emésztés

Egy restrikciós enzim-kombináció által generált elméleti fragmenthossz eloszlás kiszámításához az emberi és élesztő genomot *in silico* a DECIPHER nevű R csomag segítségével daraboltuk fel. A hasítóhely pozíciók alapján kiszámoltuk a restrikciós fragmentumok hosszát. A keletkezett fragmenthossz-eloszlások statisztikai összehasonlításához 300 véletlenszerűen kiválasztott értéket hasonlítottunk össze Wilcoxon Rank Sum teszttel 100 alkalommal. A p-értékeket Benjamini & Hochberg módszerrel korrigáltuk.

### 3.5. Spp1 ChIP kísérletek és szekvenálás (ChIP-seq)

A jelölt időpontokban 50 ml meiotikus sejtet gyűjtöttünk, majd szobahőmérsékleten 1%-os formaldehiddel 20 perc alatt keresztkötöttük. A formaldehid hatását 125 mM glicinnel nyomtuk el szobahőmérsékleten 5 perc alatt, majd mostuk a sejteket három alkalommal jéghideg 1x TBS oldattal (pH 7.5). A sejteket 500 µl lízis pufferben szuszpendáltuk fel, majd lizáltuk a sejteket 10 percig üveggyöngyökkel a FastPrep készülékkel. Szonikálással a kromatin mintákat átlag 300 bázispáros méretre fragmentáltuk. A teljes-sejt extraktumok begyűjtéshez 50 µl preimmunprecipitációs mintát vettünk és teljes sebességen centrifugáltuk 10 másodpercig, hogy a sejtörmelék pelletet alkosson. A minta maradék részét 12 000 rpm-en, 4°C-on 20 percig centrifugáltuk. Az immunprecipitáció során 450 µl extraktumot adtunk mágneses protein G gyöngyökhöz, amelyeket preinkubáltuk 9E11 (monoklonális egér anti-myc, ab56) vagy anti-GFP (poliklonális nyúl, ab290) antitestekkel egy éjszakán át 4°C-on. Az immunprecipitált mintákat kétszer mostuk lízispufferrel, kétszer lízispufferrel és 360 mM NaCl-el, kétszer mosópufferrel majd végezetül egyszer 1x TE (pH 7.5) pufferrel Dynal mágneses gyöngyök segítségével. A keresztkötések hővel (TE-1% SDS éjszakán át 65 °C) történő revertálása után a fehérjéket megemésztettük proteináz K-val 3 óra alatt 65 °C-on. A nukleinsavakat PCR tisztító kit segítségével tisztítottuk és RNS-t emésztést végeztünk 1 órán át 37 °C-on. Végül a DNS-t 50 µl nukleáz-mentes dH<sub>2</sub>O-ban reszuszpendáltuk.

A szekvenálási könyvtárakat az Illumina TruSeq ChIP preparációs protokoll alapján készítettük el. Röviden, az immunprecipitáció során feldúsult ChIP DNS molekulák vége javítva lett és az inzertekhez index adaptereket ligáltunk. A tisztított ligációs termékeket PCR segítségével amplifikáltuk majd megszekvenáltuk. A leolvasott szekvenciákat az *S. cerevisiae* referencia genomra illesztettük BWA algoritmussal alapbeállítások mellett. Az alacsony térképeződési értékkel rendelkező, valamint a PCR duplikátum szekvenciák szűrése után a leolvasott szekvenciák 38-67%-át tudtuk megtartani.

### 3.6. A dinamikus Spp1 csoportok azonosítása

Az Spp1 kötőhelyek kötési dinamikájuk alapján történő csoportosításához először egyesítettük az összes meiotikus időpontban azonosított Spp1 kötőhelyeket. Majd kiszámoltuk a ChIP minták átlagos log<sub>2</sub>(IP/INPUT) RPKM arányait az egyesített régiókon. A kötőhelyek ChIP mintánkénti lefedettségi értékeit z-transzformáltuk a „scale” R funkcióval. A dinamikus csoportokat k-közép algoritmussal azonosítottuk és a „pheatmap” funkcióval ábrázoltuk R-ben.

### 3.7. Statisztikai analízis

Az összes statisztikai analízist R-ben végeztük el. A csoportokat ANOVA és Tukey-féle post-hoc teszttel hasonlítottuk össze. Ha az adat nem mutatott normál eloszlást akkor Kruskal-Wallis-féle ANOVA és Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk.  $P \leq 0.001$  valószínűség értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Szignifikancia jelölések: nem szignifikáns (ns).  $P > 0.05$ ; \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P \leq 0.0001$ .

## 4. Eredmények

### 4.1. RNS-DNS hibrid (R-hurok) immunprecipitáció: egy analitikus munkafolyamat a benne rejlő torzítások becslésére

#### 4.1.1. Valós pozitív és valós negatív R-hurok asszociációk meghatározása: DRIP osztályozók bevezetése.

Az elérhető publikált DRIP protokollok alapján, valamint figyelembe véve a főbb technikai változókat, amelyek hozzájárulhatnak a megfigyelt heterogenitásokhoz, negyven DRIP kísérleti sémát terveztünk, hogy felmérjük, hogyan osztályozzák a különböző teszt lókuszokat az ismert RNS-DNS hibrid státuszuk alapján. Az osztályozókat szisztematikusan úgy terveztük, hogy vizsgáljuk a főbb faktorokat, amelyek kísérleti torzítást okozhatnak a DRIP módszerben. Az első 16 kísérlet figyelembe veszi *i.* a formaldehid fixációt, *ii.* a nukleinsav izolálás módját, *iii.* a szabad RNS eltávolítását, *iv.* a nukleinsav fragmentációt valamint *v.* a sejtlízis hőmérsékletét.

#### 4.1.2. A DRIP osztályozók teljesítményvizsgálata: referencia R-hurok régiók definiálása.

A DRIP osztályozók paramétereinek meghatározásához valós pozitív és valós negatív példákat lehet választani a tudományos szakirodalomból, figyelembe véve az ismert R-hurok profilokat; azonban, az elérhető DRIP-qPCR és DRIP-seq adatok heterogenitása arra késztetett bennünket, hogy hozzunk létre egy független R-hurok tanító halmazt. Két szorosan kapcsolódó sejttypusban DNS-RNS hibrid térképezést végeztünk (Jurkat T-sejt leukémia sejt vonal és naív CD4<sup>+</sup> T-limfocita) amely során 88.830 és 99.337 R-hurok régiót azonosítottunk. Az azonosított kötőhelyekből nagy megbízhatóságú R-hurok csúcskészletet állítottunk elő és jellemeztük a kromoszómális eloszlásukat. A csúcsok jelentősen dúsultak a gének promóterein és repetitív szakaszokon. Az R-hurok régiók alulreprezentáltak voltak a fehérjekódoló exonokon, hasonlóan a korábbi DRIP kísérletekhez, amelyeknél a nukleinsav szonikálva volt, azonban a restriktív enzimmel fragmentált minták pozitívan torzítottak az exonokon. A szonikált és restriktív enzimmel emésztett minták feltűnően más R-hurok hosszeloszlásokkal rendelkeztek (keskeny: 179-2.369 bp vs. széles: 178-22.479 bázispár) és az azonosított kötőhelyek jelentősen átfedtek az egyes csoportokon belül, de élesen elváltak a két csoport között. Ezeket a különbségeket az R-hurok méretek variabilitásának és a tanulmányozott sejttypusok heterogenitásának tulajdonítjuk. Figyelembe véve a megfigyelt eltéréseket, a konszenzus R-hurok készletünket a DRIP-osztályozók összehasonlító referenciájának tekintettük.

#### 4.1.3. RNS-DNS hibrid mennyiségek mérése a DRIP-osztályozókon.

Pozitív és negatív teszt régiókat választottunk ki az azonosított R-hurok készletből, és szisztematikusan vizsgáltuk az RNS-DNS hibrid dúsulást a DRIP-osztályozókon. Publikált DRIP tanulmányokban gyakran használt pozitív és negatív teszt régiók közül az *SNRPN*, *ZNF554*, *MYADM*, *FMRI* és *APOE* géneket választottuk. A többi régiót véletlenszerűen választottuk a konszenzus R-hurok készletből: *PRR5L*, *LOC440704*, *NOP58*, *VIM* és *ING3*.

A DRIP-qPCR hozamokat mind a kontroll és mind az RNase H kezelt mintáknál lemértük negyven DRIP-osztályozón, tíz teszt régió öt független ismétlésben. Az így kapott 4000 DRIP dúsulási érték volt a ROC analízis bemeneti paramétere.

#### 4.1.4. Az RNS-DNS hibrid azonosítás szenzitivitásának és specificitásának meghatározása.

A pozitív találatok és a kísérleti hibák közötti relatív kompromisszumokat kvantitatív módon határoztuk meg a ROC elemzésen keresztül, amely jellemzi az osztályozókat. Az érzékenységet, specificitást és a görbe alatti területet (AUC) az ROC diagramokból állapítottuk meg, és a negyven kísérlet robusztusságának objektív mértékegységeként alkalmaztuk.

Tíz DRIP-osztályozónál (5., 6., 13., 15., 17., 18., 19., 21. és 24.) nagy ( $> 0,7$ ) AUC értékeket kaptunk, ami arra utal, hogy ezek a kísérletek nagy hatékonysággal képesek az RNS-DNS hibridek jelenlétét megjósolni. Négy kísérletnél 0,5 körüli AUC értékeket kaptunk (2., 10., 11. és 16.), ami arra utal, hogy ezek az osztályozók véletlenszerű válaszokat adnak prediktív teljesítmény nélkül.

Ezen megfontolások alapján a legjobban teljesítő négy DRIP osztályozó: 5., 13., 17. és 19., 68,5-75%-os érzékenységgel és 68-79% specificitással rendelkezik. Hasonló ROC paramétereket kaptunk egy ismételten végzett kísérletben, ahol B-limfoblaszt sejtvonalat alkalmaztunk, ami bizonyította, hogy a tesztelt DRIP protokollok megbízhatósága más sejttípusokban is jól működik. A főbb kísérleti változók párhuzamos összehasonlítása nem mutatott szignifikáns különbséget *i.* formaldehid fixált és nem fixált minták között; *ii.* fenol-kloroform extrahált és szilícium-dioxid membrán tisztított nukleinsavminták között, és *iii.* DNS fragmentált (1-16) és kromatinfragmentált DRIP minták között (17-24). A sejtlízis hőmérséklet nem változtatta meg a DRIP módszer specificitását és szenzitivitását. Statisztikailag szignifikáns különbséget találtunk az RNáz A-val kezelt és a kezeletlen minták ( $p = 0,03$ ) között, ami arra utal, hogy az RNáz A hozzáadása nem javítja az RNS-DNS hibrid detektálás hatékonyságát. Az RNáz A negatív hatását a leírt DNS-kötő aktivitásával magyarázzuk, amely szelektíven távolít el nagy mennyiségű DNS régiót a nukleinsav tisztításakor. Megerősítettük, hogy az RNáz A képes erős DNS kötésre, mivel migrációs defektusokat okoz az elektroforézis során, amikor plazmid DNS-t inkubálunk az enzimmel. Az elektroforetikus mobilitás eltolódása megfigyelhető volt szupertekercselt és linerizált DNS templáton is.

Végül a szonikált és a restrikciós enzimmel fragmentált DRIP minták összehasonlításakor statisztikailag szignifikáns különbséget ( $p = 0,0002$ ) találtunk a ROC paraméterekben, ami azt sugallja, hogy az ultrahangos kezelés hatékonyabban megkülönböztethetővé teszi a valós pozitív jelek és hamis pozitív jelek elkülönítését, legalábbis a vizsgált körülmények között.

#### 4.1.5. Az R-hurkok alapvető biológiai funkciójára gyakorolt hatás.

A szuboptimális DRIP kondíciók megakadályozhatják a pontos biológiai funkció hozzárendelését az R-hurkok jelentős részéhez. Bár a restrikciós enzimatis érzékenységből származó átlagos DNS-fragmentméret illeszkedik a DRIP módszer követelményeihez, azt találtuk, hogy a vágási helyek gyakorisága szignifikánsan magasabb volt az intergénikus régiókon belül, hosszú restrikciós fragmentumokat hozva létre a fehérjekódoló gének nyílt leolvasási kereteken. A restrikciós enzim-felismerési szekvenciák nem-véletlenszerű eloszlásához kapcsolódó torzított genomi mintavétel kifejezettebb volt az exonokon, különösen az első exonoknál. Az első exonok 82%-ában csak 0-1 megfelelő restrikciós hely található az intergénikus régiókhoz képest (59%). A restrikciós enzim-vágóhelyek emésztési hatékonyságát ~ 50%-ra becsüljük az intergénikus régiókban, ami szignifikánsan csökkent a génkódoló régióknál. Következésképpen a megfelelő restrikciós helyektől hiányos génrégiók hosszú DRIP fragmentumokként jelennek meg, amelyek potenciálisan veszélyeztetik a módszer felbontását. Az R-hurkok pontos genomikus helyzetét ultrahangos kezeléssel lehet feloldani.

## **4.2. Az Spp1 Set1C alegység nukleáris dinamikája előkészíti a meiotikus rekombinációs helyeket a törés kialakulásához**

### **4.2.1. Az Spp1 statikus és dinamikus kromoszóma-kötési kinetikát mutat a meiózis során**

Az Spp1 a meiotikus profázis alatt történő kromatinkötési dinamikájának megismerése érdekében feltérképeztük az epitóppal jelölt Spp1 és Bre2 kromoszómális kötőhelyeit ChIP szekvenálással szinkronizált spórázó élesztőkultúrákban. A Bre2 eloszlását proxyként használtuk a Set1C kromoszómális pozíciójának jelölésére. Az egyes meiotikus időponthoz tartozó csúcskészleteket meghatároztuk és rendeztük, majd egyesítettük, hogy létrehozzunk egy konszenzusos kötőhely készletet. A kromatinkötő helyek átfedésének az elemzése azt mutatta, hogy az Spp1 csúcsok ~46%-a egybeesik a Bre2-vel, jelezve a Set1C-hez társuló, illetve attól független Spp1 molekulák csoportját a meiózis során.

Fontos megjegyezni, hogy az Spp1 progresszív növekedést mutatott a Mer2 kötőhelyeken a meiotikus profázis alatt, míg a Bre2 a sporulációs folyamat során teljesen lecsökkent. Bár az egyedüli Spp1 kötőhelyek sokkal dinamikusabbnak tűnnek, mint a közös helyek, az utóbbi csúcsok sokkal magasabb ChIP jelet mutatnak, mint az Spp1 vagy a Bre2-höz tartozó helyek.

Annak érdekében, hogy jobban megértésük az Spp1 dinamikáját az időkinetikás Spp1 ChIP jeleken klaszteranalízist végeztünk, így az azonosított kötőhelyeket osztályokba tudtuk sorolni a hasonlóságuk alapján. Két kinetikus csoportot könnyedén felismertünk az Spp1 csúcs jelek időbeli relatív változásán alapulva: dinamikus helyek, amelyek a meiózis előrehaladtával fokozatosan megjelentek vagy eltűntek, valamint statikus helyek, amelyek állandó kapcsolatban állnak az Spp1 fehérjével. Ezeket a különálló osztályokat reprodukálta egy olyan klaszterfüggetlen megközelítés, amely az Spp1 jelintenzitások abszolút változására támaszkodott az idő függvényében.

A funkcionális elemzés azt mutatta, hogy i) a megjelenő Spp1 csúcsok erősen felülreprezentáltak a kromoszóma axiális helyein ii) az eltűnő Spp1 helyek RPG- és snoRNA-génekben és iii) az állandó Spp1 csúcsok erősen kapcsolódnak az ncRNS-hez.

Ezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az Spp1 dinamikus tulajdonságai korrelálnak a nem kanonikus (Set1C független) funkciókkal.

### **4.2.2. Az Spp1 kromatin kötésének funkcionális vizsgálata a meiózis folyamata alatt.**

Hogy megértsük az Spp1 kromatinkötődés pontos molekuláris mechanizmusát, megvizsgáltuk az Spp1PHD $\Delta$  és Spp1CxxC $\Delta$ , valamint a H3R2A és H3K4R mutánsok kötőhelyeit. A 4-es lizin mutációja megakadályozza a H3K4 metilációt, míg az arginin 2 alanin általi szubsztitúciója gátolja a H3K4me3 lerakódását. Mindkét módosítás várhatóan az Spp1PHD $\Delta$  mutáció meiotikus fenotípusait másolja le.

Időkinetikás meiotikus ChIP-seq-t végeztünk, és leképeztük a Spp1PHD $\Delta$ , Spp1CxxC $\Delta$  és Spp1 kötődését H3R2A / H3K4R mutánsokban. Amint azt az átfedések mutatják, mind a négy mutáció megszünteti az Spp1 kötőhelyek mintegy 50% -át a vad típusú törzsben a meiózis során.

A következő lépésben az azonosított kötőhelyeken többdimenziós skálázási elemzést alkalmaztunk, hogy kiemeljük az időbeli és a sejttípus-specifikus különbségeket az Spp1 kromoszómális lokalizációban. A vad típusú sejtek és az Spp1 PHD- és CxxC-domén mutánsok nagyon eltérő módon viselkednek a sporuláció kezdetén, majd az első két órában robosztus, gyors és azonos változást tapasztaltunk mind a vad típusú, mind a mutáns

sejtekben. A folyamat végére minden egyes sejttípus a vad típusú Spp1-hez hasonló állapothoz konvergál.

A hisztonmutáns háttérben az Spp1 kötőhelyek inkább a vad típusúhoz hasonlítanak a sporuláció elején. Ezt követően gyors és dinamikus változások következnek be az első néhány órában, úgy, hogy mindkét mutáns gyorsan eltávolodik a vad típusú állapottól. A folyamat végére mindhárom sejttípust más Spp1 állapot jellemzi.

Ezután elemeztük az Spp1 kötőhelyek átfedését funkcionális genomi elemekkel minden egyes mutánsban. A kapott csúcsok különböző genomi elemeken dúsulnak és változó átfedést mutatnak egymással.

Fontos, hogy az összes mutáció csökkenti az Spp1 kötődését a tengelyfehérjékhez, és megszünteti a Mer2 interakciót a dinamikus Spp1 csúcsokkal. A PHDΔ mutáns az RPG géneknél extrém dúsulást mutat, ami kiemeli a PHD domén szerepét az Spp1 RPG gének eltávolításában. Hasonlóképpen, a H3R2A és a H3K4R mutánsok specifikus Spp1 dúsulást mutatnak a snoRNA génekben, jelezve, hogy a H3R2 és H3K4 metiláció elősegíti az Spp1 eltűnését a snoRNS-ről.

Azt is kimutattuk, hogy az Mer2 interakció a megjelenő Spp1 kötőhelyeken megszűnik az Spp1CxxCΔ, H3R2A és H3K4R mutánsoknál. Az Spp1 PHD ujjdoménjének inaktiválása a vad típusú sejtekben kimutatott Spp1 csúcsok körülbelül 75%-át megszünteti, azonban a fennmaradó Spp1PHDΔ-helyek körülbelül fele továbbra is jelentős Mer2 dúsulást mutat. Ez ellentétben van az Spp1CxxCΔ kötőhelyekkel és a H3R2A / K4R mutációk hatásával, amelyek nyilvánvalóan megakadályozzák a Mer2 dúsulást. Összehasonlításképpen elemeztük a Mer2 kapcsolatát a klaszteranalízissel meghatározott Bre2 kötőhelyek dinamikus klasztereivel. A megjelenő Bre2 kötőhelyek felett egyértelműen alacsony Mer2 jelet azonosítottunk.

Ezek az eredmények együttesen tovább erősítik a meiotikus DSB képződés hurok-tengely modelljét. Az Spp1 a kromoszóma axiális helyekhez való kihorgonyzásódásához szükség van: i) az Spp1 Mer2-kötő (CxxC) motívumára, ii) kisebb mértékben a PHD ujjdoménre, és iii) hiszton módosításokra és módosítható oldalláncokra (H3K4me3, H3R2me2s).

## 5. Diskusszió

### 5.1. RNS-DNS hibrid (R-hurok) immunprecipitáció: egy analitikus munkafolyamat a benne rejlő torzítások becslésére.

Tekintettel arra, hogy az RNS-DNS hibrid struktúrák egyre nagyobb figyelmet kapnak a kromoszómák élettanában és patológiájában, bemutatunk egy analitikus keretrendszert a meglévő DRIP protokollok inherens torzításának becsléséhez és a technológia hatékonyságának felméréséhez. A ROC paraméterek objektív mérőszámot szolgáltatottak az RNS-DNS hibridek jelenlétének vagy hiányának megjelölésének hatékonyságára.

Először meghatároztuk a DRIP hozamokat az adott kísérleti rendszerekhez több genomi régióban. Ez lehetővé tette számunkra, hogy rangsoroljuk a DRIP munkafolyamatokat az alapján, hogy hogyan képesek a komplex vagy gyenge DRIP-qPCR jelek megkülönböztetni a háttérzajtól nagy megbízhatósággal. A legmagasabb teljesítményű kísérletek az alábbiak voltak: 5, 13, 17 és 19. Azonban számos DRIP séma nem bizonyult megbízhatónak, véletlenszerű válaszokat adtak: 2, 10, 11 és 16.

A DRIP kísérleti rendszer főbb paraméterei - a formaldehid keresztkötés, a sejtlízis hőmérséklet, a nukleinsav izolálás, a szabad RNS-eltávolítás és a DNS-fragmentáció bevonásával megállapítottuk, hogy a nukleinsav fragmentálása szonikállással és az RNázA emésztés elhagyásával javíthatjuk az RNS-DNS hibridek detektálásának a precizitását és specificitását.

Ezután megmutattuk, hogy az enzimatis fragmentáció a nagy DRIP fragmentumok felülreprezentálódásához vezet a kódoló régióknál, ami különösen jellemző volt az első exonokon. Ez a jelenség erősen befolyásolta a módszer felbontását, és ezáltal az R-hurok tiszta biológiai funkcióinak meghatározását. Ezen túlmenően a torzított genomi mintavételezés számos olyan molekuláris biológiai technikát érint, amelyek a restriktációs enzim genom fragmentációját alkalmazzák, például 3C/4C/5C, Hi-C és a biszulfít szekvenálás.

A fenti tapasztalatok alapján a következő finomításokat javasoljuk a DRIP kísérleti rendszerekben az RNS-DNS hibridek pontos becsléséhez: 1. HCHO fixáció és RNáz A kezelés elhagyása, nukleinsav izolálása szilícium-dioxid membrán (kit) tisztítással, nukleinsav fragmentációja ultrahanggal, majd immunprecipitáció S9.6 antitesttel. 2. Ha formaldehid fixációt alkalmazunk, javasoljuk az oldható kromatin előkészítését, és a preparátum szonikálással történő szétdarabolását, majd szerves extrakciót és immunprecipitációt az S9.6 antitesttel. 3. Ha a restriktációs enzim fragmentációját alkalmazni kell, javasoljuk a DNS-fragmens méreteloszlás gondos ellenőrzését az immunprecipitáció előtt.

Fontos előfeltétel, hogy ajánlásaink a tanulmányban vizsgált kísérleti körülményekre vonatkoznak. Az általánosítást el kell kerülni, mivel a kísérletben lévő kritikus paraméterek megváltoztatása (például az S1 nukleáz vagy lambda exonukleáz emésztés vagy a modellszervezet megváltoztatása) jelentősen befolyásolhatja az RNS-DNS hibrid detektálás kimenetelét.

Összefoglalva, a DRIP módszer továbbra is aranystandard, amely az R-hurok régiók azonosítására szolgál az egyes kromoszómákon, de folyamatos erőfeszítésre van szükség alternatívák találására és a kiegészítő protokollok tesztelésére. Reméljük, hogy ezt a célt legalább részben elérte ez a tanulmány, amely segít a valós R-hurok kötési események felismerésében, és lehetővé teszi a DRIP-seq térképezési adatok jobb értelmezését.

### 5.2. Az Spp1 kromatinkötésének funkcionális vizsgálata a meiózis folyamata alatt.

Az Spp1 kromoszómális kötőhelyeinek azonosításával, valamint a Set1C Bre2-vel történő átfedése során kiderült, hogy az Spp1 specifikus szubpopulációja a Set1C-től függetlenül viselkedik a meiotikus progresszió során.

Emellett három Spp1 alosztályt találtunk különböző kötési affinitással és dinamikával: megjelenő, eltűnő és statikus alosztályt. Az Spp1 megjelenő osztálya fokozatosan jelenik meg Mer2/Red1 kötődő régiókban a meiózis során, ami *de novo* kölcsönhatást mutat a kromoszóma tengelyével. Ezek a tengely-proximális hurkok lehetővé teszik a Spo11 számára, hogy DSB-ket generáljon. Az eltűnő Spp1 helyek a represszált génekhez kapcsolódnak, ami azt sugallja, hogy az Spp1 felszabadulhat az represszált génről, és alacsony dúsulást mutat Mer2/Red1 helyeken. Érdekes módon, azt találtuk, hogy az eltűnő helyek RPG és snoRNA génekhez kapcsolódnak, amelyeket a sporulációs közegbe történő átvitel utáni első órákban átmenetileg elnyomnak.

Továbbá, megvizsgáltuk az Spp1 specifikus fehérje motívumainak fontosságát és szerepét a hurok-tengely kialakulása során. Pontosabban, időkinetikus meiotikus ChIP-seq-et végeztünk, és leképeztük a Spp1PHD $\Delta$ , Spp1CxxC $\Delta$  és Spp1 kötődését H3R2A/H3K4R mutánsokban. Eredményeink azt mutatták, hogy az Spp1CxxC $\Delta$  mutánsban a Mer2 dúsulás megakadályozható az újonnan kialakult Spp1 csúcsok felett, és jelentősen csökken az Spp1PHD $\Delta$  mutánsban. Ezek a funkcionális adatok a PHD és CxxC motívumok jelentőségére utalnak. Érdekes módon, amikor a H3R2 és H3K4 oldalláncok mutálódnak H3R2A és H3K4R-re, az Spp1-nek az axiális helyekhez való kötődése zavart szenved, míg az Spp1 még képes volt kolokalizálni a Mer2 fehérjével.

Összefoglalva, a disszertációban bemutatott megállapításaink az Spp1-et dinamikus kromatinkötési jellemzőkkel rendelkező sokrétű fehérjeként azonosítják, és a meiotikus kromatinszerkezet keretén belül tovább támogatják a hurok-tengely modellt.



## 6. Összefoglalás

### 6.1. RNS-DNS hibrid (R-hurok) immunprecipitáció: egy analitikus munkafolyamat a benne rejlő torzítások becslésére.

- Figyelembe véve a fő kísérleti változókat (formaldehid keresztkötés, sejtlízis hőmérséklet, nukleinsav izolálás, szabad RNS eltávolítás és DNS fragmentáció), 40 különböző DRIP séma érzékenységét és specificitását vizsgáltuk több genomi régióban. Összességében azt találtuk, hogy a nukleinsav fragmentálása ultrahangos kezeléssel és az RNáz A emésztés elhagyása javíthatja az RNS-DNS hibrid detektálás specificitását.
- A DRIP-seq adatkészletek összehasonlító elemzése azt mutatta, hogy a restriktációs enzim emésztés a hosszú DRIP fragmentumok felülreprezentálódásához vezet, ami különösen kifejezett az első exonoknál. Ez a torzított genomi mintavételezés befolyásolja a módszer felbontását, és hatással van az RNS-DNS hibridek egy részhalmazának pontos annotációjára.

### 6.2. Az Spp1 kromatin kötésének funkcionális vizsgálata a meiózis folyamata alatt.

- Egy Set1C független Spp1 szubpopulációt azonosítottunk a meiotikus progresszió során.
- Időkinetikus meiotikus ChIP-seq alkalmazásával, három Spp1 alosztályt mutattunk ki, melyek mindegyike különböző kromatinkötési kinetikát (megjelenő, eltűnő és statikus) és biológiai funkciókat mutatott.
- Az Spp1PHDΔ, Spp1CxxCΔ, H3R2A és H3K4R mutánsok elemzésével megmutattuk, hogy az Spp1 helyes lokalizációja a kromoszómatengely helyekhez igényli: (1) az Spp1 Mer2-kötő (CxxC) motívumát; (2) kisebb mértékben a PHD ujjdomént; és (3) hisztonmódosításokat és módosítható oldalláncokat (H3K4me3 és H3R2me2s).

## 7. A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/304/2018.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Halász László  
Neptun kód: JKUKU3  
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Karányi, Z., **Halász, L.**, Acquaviva, L., Jonás, D., Hetey, S., Boros-Oláh, B., Peng, F., Chen, D., Klein, F., Géli, V., Székvölgyi, L.: Nuclear dynamics of the Set1C subunit Spp1 prepares meiotic recombination sites for break formation.  
*J. Cell Biol.* [Epub ahead of print], 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201712122>  
IF: 8.784 (2017)
2. **Halász, L.**, Karányi, Z., Boros-Oláh, B., Kuik-Rózsa, T., Sipos, É., Nagy, É., Mosolygó, Á., Türk-Mázló, A., Rajnavölgyi, É., Halmos, G., Székvölgyi, L.: RNA-DNA hybrid (R-loop) immunoprecipitation mapping: an analytical workflow to evaluate inherent biases.  
*Genome Res.* 27, 1063-1073, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.219394.116>  
IF: 10.101



## 8. További közlemények listája



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

### További közlemények

3. Hegedűs, É., Kókai, E., Nánási, P. P., Imre, L., **Halász, L.**, Jossé, R., Antunovics, Z., Webb, M. R., El Hage, A., Pommier, Y., Székvölgyi, L., Dombrádi, V., Szabó, G.: Endogenous single-strand DNA breaks at RNA polymerase II promoters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res. [Epub ahead of print]*, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky743>  
IF: 11.561 (2017)
4. Roszik, J., Fenyőfalvi, G., **Halász, L.**, Karányi, Z., Székvölgyi, L.: In Silico Restriction Enzyme Digests To Minimize Mapping Bias In Genomic Sequencing. *Mol. Ther. Methods. Clin. Dev.* 6, 66-67, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.omtm.2017.06.003>  
IF: 3.681

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 34,127**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
18,885**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.09.12.

